

이상추출배양을 통한 *Botryococcus braunii*에서의 탄화수소 생산

심상준*, 안진영, 김병우

성균관대학교 화학공학과

전화 (031) 290-7341, Fax (031) 290-7272 *

Abstract

The green colonial algae *Botryococcus braunii* is characterized by unusual high hydrocarbon contents, ranging from 15 to 75% of dry weight, as long-chain unsaturated hydrocarbons. In two-phase bubble column using various organic solvents, poor recovery (18 - 32%) of hydrocarbon seems to be caused by insufficient mixing between two phases, which was operated using only aeration on the narrow interface between hydrophobic solvent and cell suspension. In addition, hydrocarbon was entrapped tightly in cell-matrix (formed by exopolysaccharide) of algal colony, which make difficult to extract using two-phase system. To improve recovery efficiency, mixed-solvent of extractive solvent (octanol) and biocompatible solvent (octane) was tested in two-phase column for *in situ* extraction. In two-phase extraction culture using mixed-solvent, the algal growth was intensely inhibited even at low concentration of polar octanol solvent. the hydrocarbon recovery in two-stage cell-recycle extraction showed a 2.9 fold increase (57%) over that in two-phase extraction. Up to 60 % of hydrocarbon could be recovered without serious cell-damage in the case of downstream separation for 6 h at the high recycle flow rate using this process after batch culture.

서론

건조질량의 15~75 %의 탄화수소를 생산한다고 알려진 green colonial algae인 *B. braunii*는 화석연료를 대체할 재생 생물연료(renewable biofuels)로 제시되고 있다. 생산된 탄화수소의 대부분은 균주 외벽의 다당류에 의해 형성된 matrix인 external pool에 존재한다.^{1, 2)}

본 연구에서는 균주의 배양과 동시에 생산물을 회수할 수 있는 동시추출공정을 *B. braunii* 배양에 적용하고자 한다. 일반적으로 미생물을 이용한 발효에 있어 생산물이 미생물의 성장과 활성을 저해하는 경우 독성이 작고 생산물에 대해 용해도가 높은 용매를 이용하여 미생물 표면 혹은 배양액 중에 포함된 생산물을 분배계수 차이에 의해 용매층으로 회수하는 동시추출법을 이용한다.^{3, 4)} 그러나 *B. braunii*의 경우 생산된 탄화수소가 균주 외벽의 matrix에 강하게 부착되어 있기 때문에, 가장 일반적인 동시추출법인 two-phase 추출공정 적용시 bubble column내에서 단지 폭기에 의한 교반만으로는 충분한 탄화수소의 회수율을 얻을 수가 없었다.

이러한 문제를 극복하기 위해, 본 연구에서는 탄화수소 회수에 유리한 극성용매와 조류성장에 유리한 비극성 용매용매를 혼합한 유기용매를 two-phase 동시추출공정에 이용하고, 또한 미세조류의 배양 column과 탄화수소의 추출은 위한 two-phase column 사이에 배양액

을 재순환시키는 two-stage 동시추출공정을 개발하여 탄화수소의 회수율을 높이고자 하였다.

재료 및 방법

사용된 균주는 green colonial algae인 *B. braunii* UTEX 572이며, 배지는 modified CHU13을 이용하였다. 본 연구에 사용된 동시추출을 위한 500ml 용량의 bubble column에서의 배양조건은 외부광도는 $100 \mu E/m^2 \cdot s$, 배양온도는 $25^\circ C$ 로 고정하였고, 1% CO_2 혼합공기를 100 ml/min으로 공급하였다.

균체의 농도는 680nm에서 흡광도를 측정하여 건조중량을 추정하였다 (Dry biomass (g/L) = $0.515 \times OD_{680}$). 탄화수소는 10 ml 배양액을 $80^\circ C$, 24h 건조시킨 후 acetone과 초음파균질기(VC 100, Materials & Sonics Inc., USA)를 이용하여 추출한 다음, silica gel로 충전된 chromatography column(2×7cm)에서 탄화수소만을 정제한 다음, GC(FID)로 분석하였다. 정량을 위한 internal standard로 squalene을 사용하였다.

결과 및 고찰

Table. 1에 two-phase 동시추출공정에 의한 탄화수소 회수율, 유기용매가 조류의 성장 미치는 저해도, 탄화수소 생산량 증대를 정리하였다. Two-phase 동시추출공정에 의한 탄화수소 회수시 bubble column내 유기용매와 배양액 두 상 사이 좁은 경계면(I.D.=30 mm)에서의 단지 폭기(aeration)에 의한 교반만으로 인한 불충분한 배양액과 유기용매와의 접촉기회로 인해 비교적 낮은 회수율을 가져오는 문제를 야기시켰다. 이러한 문제를 극복하기 위해, 높은 탄화수소 회수를 얻을 수 있는 강한 극성용매인 octanol³⁾과 선행 연구에서 조류에 가장 독성이 적었던 octane의 혼합한 유기용매를 two-phase 동시추출공정에 적용하였다. 1% octanol-octane과 3% octanol-octane의 혼합 유기용매를 이용하였을 경우, 혼합용매 투여후 약 2일 후 1~3%의 아주 낮은 농도의 octanol에 의해 조류가 심하게 저해를 받아 조류의 색이 흰색으로 완전히 탈색되는 결과를 초래하였다. Fig. 1은 이 경우 광합성 활성도를 추정할 수 있는 엽록소의 농도를 나타낸다.

Two-stage 동시추출공정에서 최적용매로 선정된 dihexyl ether의 경우 알칸계 비극성 유기용매(10~20%) 보다 비교적 높은 회수율(20~30%)을 가지지만, 상대적으로 고가(\$230/500ml)인 단점이 있고, 높은 비점($228^\circ C$)으로 인해 분리공정이 복잡하고 많은 분리비용을 초래한다. 따라서 회수율이 개선된 two-stage 동시추출공정의 경우 분리가 용이하고 비교적 저해성이 적어 장기 운전시 유리한 octane(bp= $120^\circ C$)을 최적용매로 선정하였다.

Fig. 2은 동시추출용 용매로 octane을 이용하였을 경우에 two-phase 동시추출공정과 배양액의 재순환 속도가 3~12ml/min인 two-stage 동시추출공정에서 유기용매층의 탄화수소의 농도변화를 보여준다. two phase 동시추출공정의 경우 20%의 탄화수소 회수율을 보인 반면, 재순환 동시추출공정에서는 57%로 2배 이상의 회수율이 증가되었다. Fig. 3은 회분 배양후 후속분리공정으로 이단 재순환 추출법을 이용시 재순환 유량을 100 ml/min, 150

ml/min, 200 ml/min으로 6시간 동안 추출 한 결과이다. 재순환 속도가 높을 경우 고농도의 배양액과 유기용매의 갑작스런 접촉은 많은 양의 clump 생성을 야기시키므로 서서히 유량을 증가시켜 clump 생성을 최소화하였다. 6시간 추출실험 결과, 탄화수소의 회수율은 재순환속도가 100 ml/min, 150 ml/min, 200 ml/min일 경우 각각 45%, 62%, 53%로 나타났다. 배양액의 재순환 속도가 증가할수록 clump의 생성량이 증가되고, 생성된 clump가 유기용매층으로 밀려 올라감으로 인해 탄화수소 회수율을 감소시키게 된다.

본 연구에서 개발된 재순환 동시추출 공정을 이용하여 기존의 two-phase 동시추출공정보다 2배 이상 높은 탄화수소 회수율을 얻을 수가 있었다. 또한 배양액의 재순환 속도의 변화를 통해 회분배양 후 후속분리공정으로 이용하였을 경우 6시간 추출후 62 %의 회수율을 얻을 수가 있었다..

요 약

본 연구에서는 균주의 배양과 동시에 생산물을 회수할 수 있는 동시추출공정을 건조질량의 15~75 %의 탄화수소를 생산한다고 알려진 *B. braunii* 배양에 적용하고자 한다. 일반적인 two-phase 동시추출공정의 적용시 *B. braunii*의 경우 생산된 탄화수소가 균주 외벽의 matrix에 강하게 부착되어 있기 때문에, two phase 추출공정 적용시 bubble column내에서 단지 폭기에 의한 교반만으로는 충분한 탄화수소의 회수율을 얻을 수가 없었다. 본 연구에서는 배양액과 유기용매층의 접촉기회를 증대시킨 two-stage 동시추출 공정을 개발하여 기존의 two-phase 동시추출 공정보다 2배 이상 높은 57 %의 탄화수소 회수율을 얻을 수가 있었고, 이를 회분배양후 후속분리공정으로 이용할 경우 6시간 추출후 62 %의 회수율을 얻을 수가 있었다.

참고문헌

1. P. Metzger, C. Berkloff, E. Casadevall and A. Coute, "Alkadiene- and botryococcene-producing races of wild strains of *Botryococcus braunii*" (1985), *Phytochemistry*, vol. **24**, pp 2305-2312.
2. E. Casadevall, D. Dif, and C. Largeau, "Studies on batch and continuous culture of *Botryococcus braunii*" (1985), *Biotech. Bioeng.*, vol. **27**, pp 286-295.
3. J. Frenz, C. Largeau, and E. Casadevall, "Hydrocarbon recovery and biocompatibility of solvents for extraction from cultures of *Botryococcus braunii*" (1989), *Biotech. Bioeng.*, vol. **34**, pp 755-762.
4. J. Frenz, C. Largeau, and E. Casadevall, "Hydrocarbon recovery by extraction with a biocompatible solvent from free and immobilized cultures of *Botryococcus braunii*" (1989), *Enzyme Microb. Technol.*, vol. **11**, pp 717-724.

Table 1. Effects of various solvents on the cell growth and the hydrocarbon production in two-phase column.

Solvent	Hydrocarbon amounts (mg) at the end of culture			Hydrocarbon Recovery (%)	Production Increase (%)	Growth Inhibition (%)
	Cell broth	Solvent layer	Total			
Control	227	-	227	-	-	-
n-Octane	198	49	247	20	9	10
n-Dodecane	204	53	257	21	13	27
n-Tetradecane	201	45	245	18	9	18
n-Hexadecane	211	56	267	21	18	21
Diethyl ether	185	84	269	32	19	45

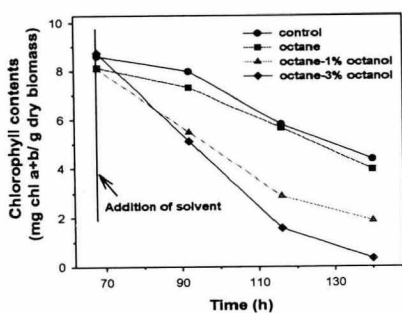


Fig. 1. Effects of octanol-octane mixture on the photosynthetic activity estimated by chlorophyll contents

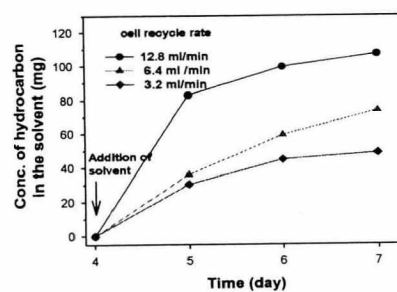


Fig. 2. Time courses of recovered hydrocarbon in the solvent layer by two-stage cell-recycle extraction

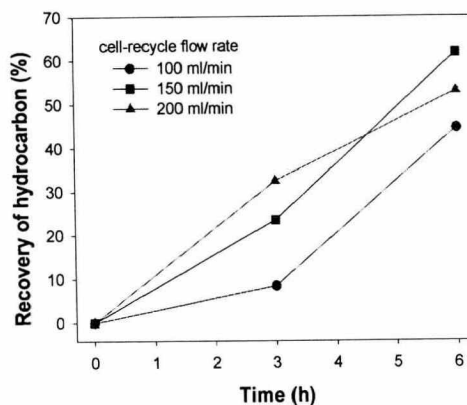


Fig. 3. Effects of cell-recycle flow rate on the hydrocarbon recovery by downstream separation